

⑫ 公表特許公報 (A)

平5-501399

⑬ 公表 平成5年(1993)3月18日

⑭ Int. Cl.¹

A 61 K 39/395

識別記号

ADZ D
U

庁内整理番号

8413-4C
8413-4C審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門 (区分) 3 (2)

(全 14 頁)

⑯ 発明の名称 敗血症の症状を治療する方法および組成物

⑰ 特 願 平2-511133

⑱ 出 願 平2(1990)7月30日

⑲ 翻訳文提出日 平4(1992)1月31日

⑳ 国際出願 PCT/US90/04250

㉑ 国際公開番号 WO91/01639

㉒ 国際公開日 平3(1991)2月21日

優先権主張 ㉓ 1989年8月1日 ㉔ 米国 (US) ㉕ 387,817

⑳ 発 明 者 ウレヴィツチ リチャード

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92014 デル マー ダ ク
チヤラ 1127

㉖ 出 願 人 スクリップス クリニック ア

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース
ンド リサーチ ファウンダー トーリー バインズ ロード 10666
シヨン

㉗ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外6名

㉘ 指 定 国 AT (広域特許), AU, BE (広域特許), CH (広域特許), DE (広域特許), DK (広域特許), ES (広域特許), FI, FR (広域特許), GB (広域特許), IT (広域特許), JP, LU (広域特許), NL (広域特許), NO, SE (広域特許)

最終頁に続く

特許 (内容に変更なし)

請求の範囲

1. 治療効果量の抗CD14抗体を患者に投与することを含む敗血症の治療方法。
2. 前記抗CD14抗体がリボ多糖結合たんぱく質複合体のCD14への結合を阻害するモノクローナル抗体である請求項1記載の方法。
3. 前記モノクローナル抗体がハイブリドーマATCCT1B22Bまたはその抗CD14抗体分子発現細胞によって生産される請求項2記載の方法。
4. 前記モノクローナル抗体が抗CD14抗体分子の下 (ab'), 部分を含む請求項2記載の方法。
5. 前記治療効果量が1日当たり体重1キログラム当たり0.1乃至20ミリグラムである請求項2記載の方法。
6. 前記方法がさらに實質的に同時に殺菌量の抗生物質を前記患者に投与することを含む請求項1記載の方法。
7. 前記抗生物質がグラム陰性菌に対して有効な抗菌剤である請求項6記載の方法。
8. 前記敗血症がグラム陰性菌の感染に由来する請求項1記載の方法。
9. 前記敗血症がウイルス、グラム陰性菌または菌類の感染に由来する請求項1記載の方法。
10. 前記方法がさらに實質的に同時にTNF血中濃度減少量の抗TNF抗体を前記患者に投与することを含む請求項1記載の方法。
11. 前記方法がさらに前記抗CD14抗体と實質的に同時に殺菌量の抗生物質を前記患者に投与することを含む請求項10記載の方法。
12. 前記患者が以下に示す症状: 成人呼吸器不全、分散性血管内凝血、腎臓疾患および肝臓疾患のうちの1つ以上の症状を示す請求項1記載の方法。
13. 前記敗血症が化学的または物理的外傷に由来する請求項1記載の方法。
14. 患者の内毒素血症の症状の改善方法で、該患者に単球マクロファージ系統細胞によるリボ多糖誘導型腫瘍壊死因子分泌を阻止するのに十分な量の抗CD14抗体を投与することを含む方法。
15. 前記抗CD14抗体がリボ多糖結合たんぱく質複合体のCD14への結合を競争的に阻害するモノクローナル抗体である請求項14記載の方法。

16. 前記モノクローナル抗体がハイブリドーマATCCT1B22Bまたはその抗CD14抗体分子発現細胞から生産される請求項15記載の方法。
17. 患者の敗血症の治療方法で、該患者に治療効果量の抗リボ多糖結合たんぱく質抗体を投与することを含む方法。
18. 患者の敗血症の治療方法で、該患者に治療効果量のリボ多糖結合たんぱく質のペプチドアナログを投与することを含む方法。
19. 前記ペプチドアナログが以下の式:

CNRCNRAPQPDELY,
YTTPEPSELDDDEDFRC、または
KRVDADADPRQYADTC.

20. 変換されるアミノ酸配列を有する請求項18記載の方法。
21. 逐次的に許容可能な感形剤中、LPS-LBP複合体のCD14への結合を阻止し得る抗CD14抗体分子を含む単位投与量の治療組成物。
22. 請求項20記載の組成物で、さらに殺菌量の抗生物質を含む組成物。
23. 請求項21記載の組成物で、さらに殺菌量の抗生物質を含む組成物。
24. 活性成分として敗血症の治療のためにヒトに投与するのに適した濃度の、LPS-LBP複合体のCD14への結合を阻止し得る抗CD14抗体分子ならびに、抗生物質および抗TNF抗体分子のうちの1つまたは両方を含む組成物。

特許(内容に変更なし)
要 約
 敗血症の症状を治療する方法および組成物

(関連技術)

本発明は敗血症の予防または治療に関する方法および組成物に関する。特に本発明はCD14単球分化抗原またはLPS-LBP複合体に結合し、そのことによってCD14発現細胞によるLPS-LBP複合体の結合を阻止する分子に関する。

(背景)

敗血症はトキシンによって誘発される病気で、そのトキシンは一般に感染や外傷によって誘発または悪化される。一般に敗血症の初期症状には悪寒、多量の汗、異常な発熱、震戦などがあり、引きついで恒常的発熱、ショックを起こす低血圧、好中球減少症、白血球減少症、分散性血管内凝血、成人呼吸器症候群および多臓器官障害などが起こる。

敗血症誘発トキシンは病原性バクテリア、ウイルス、植物および毒菌と関連していることが分っている。バクテリアトキシンの中でよく分かっているものにグラム陰性菌のエンドトキシンまたはリポ多糖(LPS)がある。これらの分子は全てのグラム陰性菌の外膜に存在する糖質である。ほとんどのLPS分子の化学構造は複雑かつ多様であるが、その一般的特徴にはLPSのリピドA領域がある(リツェル(Rietschel)、E. Th. 等、"エンドトキシンハンドブック"、1:187-214、R. M. プロクター(Proctor)およびE. Th. ソーシェ(Rietschel)編、エルスピア版、アムステルダム(1984))。生体系におけるリピドAの認識が全てではないにしても多くの敗血症の病理生理学的変化を開始させる。

現在、宿主(ヒトを含む)のLPSへの一次応答が単球/マクロファージ系統の細胞によるLPSの認識と関連し、ついで一般にサイトカインと呼ばれている物質を含む多くの細胞産物の急速な生成が起こるという主張が支持されている。

敗血症、特にLPSへの応答に関すると考えられている他の細胞には多形核白血球および内皮細胞がある。

これらの細胞もLPSに反応し強力な炎症物質を生成し得る。

特に成人呼吸器症候群(ARDS)の場合、LPSがグラム陰性敗血症におけ

ウェイス(Weiss)等、J. Immunol.、132:3109-3115(1984)。BPIとは対照的に、LBPはグラム陰性菌に対して直接的細胞毒性を示さず(トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem. 263:13479-13481(1988))その詳細な機能は不明である。

その他の背景として、単球/マクロファージ系統の細胞は微生物の食作用、抗原物質の取り込みおよびヘルパーT細胞を刺激する形態の提示などを含む多様な免疫機能を行う。おそらくこれらも腫瘍に対する免疫探索に関連しており、ある種の補体成分やサイトカインを分泌している。表面膜抗原はこれらの活性を調節する上で重要な働きをしている。いくつかの単球/マクロファージ表面抗原が同定され、それらの分子量が決定された。これらの抗原の一つであるCD14は単球、マクロファージおよび活性化顆粒球が発現する55KDの糖たんぱく質である。これはMO2、MY4、3C10およびLEUM3を含む多くのモノクローナル抗体(mAb)で認識される。CD14の生物学的機能は分かっていないが、成熟細胞におけるその制限的発現は重要なエフェクター機能を暗示している。単球細胞表面分化抗原CD14をコードする遺伝子のヌクレオチド配列が決定され、それからCD14のアミノ酸配列が導かれた。(フェレロ(Ferrero)等、Nucleic Acids Research, Vol. 16:4173(1988))

(発明の概要)

本発明はサイトカインの生産および放出の基本的レギュレーターは、特に単球/マクロファージ系統の細胞の場合、CD14レセプターであるという発見から生まれた。サイトカインの分泌が敗血症の症状の発現に重要な役割を果たしていることから本発明はサイトカイン、特にTNFの分泌を阻止する方法および試薬に関する。

それゆえ、ある態様において本発明は敗血症の危機にある患者に治療効果量の抗CD14抗体、抗LBP抗体、LBPペプチドアナログもしくはこれらの組合せ物を好ましくは静脈注射で投与することに関する。この方法は単独、もしくは抗生物質、ステロイド、抗TNF抗体、TNFアンタゴニストなど1つ以上の試薬で治療することを含む敗血症の症状を阻止または軽減することが知られている他の治療法と組合せて使用できる。

特許平5-501399 (2)

ヒトの死亡の第1の原因となると信じられている。ヴァンデベンター(van Deventer)等、Lancet、1:805(1986)、ゾーグラー(Ziegler)等、J. Infect. Dis.、156:19-28(1987)。たとえば最近、特定のサイトカイン、腫瘍壊死因子アルファ/カヘクチン(TNF)は敗血症ショックの一次伝介物であると報告されている。

ビュートラー(Beutler)等、N. Eng. J. Med.、318:879(1987)

実験動物やヒトへのバクテリア由来LPSエンドトキシンの静脈注射がTNFの急速かつ一時的放出が起こる。ビュートラー(Beutler)等、J. Immunol.、135:3972(1985)。マチソン(Mathison)等、J. Clin. Invest.、81:1925(1988)。TNFが敗血症ショックの重要な仲介物であるという証拠は基本的に抗TNF抗体による動物の前処理が死亡率を減らすという実験から得られた。ビュートラー(Beutler)等、Science 229:868(1985)、マチソン(Mathison)等、J. Clin. Invest.、81:1925(1988)。これらの報告はLPSまたは他の因子によって引き起こされるTNFの分泌が敗血症の致死的原因を軽減することを示している。

血液にLPSを導入すると、それがリポ多糖結合たんぱく質(LBP)と呼ばれるたんぱく質と結合する。LBPは健康なヒトや動物の血清中に100ng/ml程度の濃度で存在する60KDの糖たんぱく質である。

急性状態の場合、LBPは肝細胞で合成され、血清中の濃度は30~50μg/mlに達する。LBPは急性状態のヒトやウサギの血清から精製できる。トビアス(Tobias)等、J. Exp. Med. 184:777-783(1986)。LBPはLPSのリピドA領域を認識し、ラフおよびスームズ型LPSと高アフィニティー1:1の化学量論的複合体を形成する。トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem. 264:10867-10871(1989)。LBPは殺菌性透過促進因子(BPI)として知られているLPS結合たんぱく質とホモロジーを持つN末端配列を有している。トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem. 263:13479-13481(1988)。BPIはPMNの特定の顆粒中に保存されており(ウェイス(Weiss)等、Blood、69:852-859(1987))、LPSに結合しその透過性バリアーを破壊することによりグラム陰性菌を殺す。

さらに本発明は敗血症の症状を阻止または軽減するのに有用な典型的には単位投与量形の治療組成物に関する。この組成物には活性成分として抗CD14抗体、抗LBP抗体およびLBPアンタゴニストとして働くLBPペプチドアナログを1つ以上含む経腸的に許容し得るキャリアーが含まれる。好ましい態様において本発明の治療組成物にはさらに活性成分として抗生物質、ステロイド、抗TNF抗体、TNFアンタゴニスト、可溶性CD14など敗血症の症状を阻止または軽減することが知られている試薬を単独または組合せ物の形で含まれる。

(図面の簡単な説明)

図面は本発明の公開の一部を構成する。

第1図はLBPがE LPSとMOとの相互作用を促進することを示している。単一のMOを複数の量のLBP存在下EまたはE LPS¹とインキュベートしその吸光度を測定した。コントロールとしての急性状態たんぱく質、マンノース結合たんぱく質(MBP)(5μg/ml)はE LPS¹の結合を促進しなかった(吸光度0.9)。

これらの結果は4回の別個の実験における代表的なものである。

第2図はE LPSのMOへのLBP依存的結合がE液中のLPSの濃度に依存することを示している。E LPSを複数の量のLPSで置換し、5μg/ml LBPの存在下、または非存在下単一のMOとインキュベートした。それらの結果は4回の別個の実験における代表的なものである。

第3図はMOがLPS非存在下ではLBPを認識しないことを示している。ピオチンおよびストレプトアビジンでコートしたE(BAV)をピオチン化LBPとインキュベーションしてE LBPを生成させた。E LBPおよびE BAVの両方を37℃で20分間複数の量のLPSとインキュベートし、洗淨後単一のMOへの結合を測定した。

第4図はLBPがFc仲介作用を促進することを示している。単一のMO(5日間培養)を複数の量の抗E-1 IgGの存在下、45分間E、E LBPまたはE C3bとインキュベートした。Eの食作用は材料の方法のセクションで説明する方法で測定した。E LBPはMOとのインキュベーションの際にE LPS¹に1μg/mlのLBPを添加することにより得られた(0.3μg

LPS/3×10⁴ E)。抗E18Gの非存在下におけるEの吸着は以下のとおりであった：E、吸着指数(AI)→O:EC3b1、AI→417;ELBP、AI→404。これらの結果は4回の別個の実験における代表的なものである。

第5図はリガンドコート表面にMOを吸着する際の過酸化水素の分泌を示している。3×10⁴個のMO(3日間培養)をコートしたマイクロプレートのウェルに添加し、随時的に過酸化水素の発生を測定した。過酸化物の発生は免疫複合体(HSA-抗HSA、黒丸)上へのブレーティングまたは可溶性アゴニストPMAに反応して(黒ダイヤモンド)起こった。LPSコート化表面との相互作用の際には低い再現性のある過酸化物の放出が観察された(白三角)。しかし、LBPコート化表面へのブレーティングの場合放出は起こらず(白四角)、またLPSコート化表面へのLBPのコーティングはLPSにより誘導される過酸化物の生成が阻害された(白ダイヤモンド)。LBPコート化ウェル中のMOはPMAに反応した正常な過酸化物の発生を示すことからLBPが過酸化物の生成や固定を妨害することはなかった。

第6図はモノクローナル抗CD14抗体によるLPS-LBP複合体結合の阻害を示している。単層のヒトMOを0℃で15分間指示濃度のモノクローナル抗体とインキュベートした。LPSとLBPで順次コートした赤血球を添加し、その吸着を測定した。これらの結果は3回の別個の吸着実験および固定濃度の抗体を用いて行った10回の別個の実験における代表的なものである。マクロファージ上の別の決定基に対する多くの高濃度のmAbはELBPの結合に与える影響も示さなかった。

第7図は表面に結合した抗CD14mAbがLBP-LPS複合体の結合を低減することを示している。単層のヒトマクロファージを指示モノクローナル抗体25μg/mlでコートした基質に定着させた。この細胞を洗浄後ELPS¹⁸を添加し、その吸着を測定した。

第8図はLPSがTNF生産を誘導するのにLBPが必要とされることを示している。ウサギの腹腔液マクロファージ(PFM)に指示濃度のLBP(LBP)加熱(炭性)LBP、ウシ血清アルブミン(BSA)またはウシ胎児血清(FCS)の存在下LPSを作用させた。

S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
W	Try	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

全てのアミノ酸配列は左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方法で示されている。さらにアミノ酸配列の始めまたは終りにあるダッシュはさらに1つ以上のアミノ酸残基配列につづくペプチド結合を示している。

種々の文法型の“抗体”という言葉は免疫グロブリン分子および、または免疫グロブリン分子の免疫学的に居る部分、すなわち抗体結合部位またはパラトープを含む分子を含む組成物を意味する。

好ましい形態において使用される抗体はアフィニティー精製したものである。

“抗体結合部位”とは抗原を特異的に結合する重鎖および軽鎖の可変および超可変部からなる抗体分子の領域部分である。

種々の文法型の“抗体分子”という語句は本来の免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に居る領域の両方を示している。

代表的抗体分子には本来の免疫グロブリン分子、実質的免疫グロブリン分子および当分野でFab、Fab'、F(ab')₂およびF(r)として知られている領域を

そのPEMによって生産されるTNF量を測定した。

第9図はLBPのトリプシン消化に対する感受性をそれが結合するリガンド、すなわちR555LPSの存在下または非存在下の条件で示している。分子重量マーカー(ファルマシア、ビスカタウェイ、N.J.:カタログNo.17-0448-01;94キロダルトン(KD)のホスホリラーゼB、87KDのウシ血清アルブミン、43KDのオバリン、30KDのカルボニックアンハイドラーゼ、20.1KDの大豆トリプシンインヒビターおよび14.4KDのアルファラクトアルブミン)をLBPを含むレーンの隣りに示した。これらの結果はLPSへのLBPの結合はLBPの構造変化を生じ、このことはLPS-LBP複合体の一部として存在するときのみCD14を結合する能力を説明することを示している。

(説明の詳細な説明)

A. 定義

アミノ酸残基：ここで述べられているアミノ酸残基はL型のものが好ましい。しかし、そのポリペプチドが免疫グロブリン結合の望ましい機能を維持するかぎりD型残基でL型アミノ酸残基で置換し得る。NH₂はポリペプチドのアミノ末端に存在するフリーのアミノ基を意味する。COOHはポリペプチドのカルボキシ末端に存在するフリーのカルボキシ基を示す。標準的ポリペプチド命名法;J. Biol. Chem. 243:3552-58(1968)に従ってアミノ酸残基の略号を以下の対応表に示す。

対応表		アミノ酸
記号		
(1文字)	(3文字)	
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン

含むパラトープを有する免疫グロブリンの一部がある。これらの免疫グロブリンの一部は本治療法に有用である。

抗体分子のFabおよびF(ab')₂部分は当分野でよく知られている方法により実質的免疫グロブリンを各々バインおよびペプシンでたんに分解することにより得られる。たとえば米国特許No.342,568、セオフィロポラス(Theofilopoulos)等(本明細書では参考として引用している)参照。Fab'抗体分子部分はよく知られており、2つの重鎖を結合するジスルフィド結合をメルカプトエタノールで還元し、生成したたんぱく質メルカプタンをヨードアセトアミドなどの試薬でアルキル化することによりF(ab')₂部分から生成する。本来の抗体分子を含む抗体が好ましく、例にはこれが使用される。

種々の文法型の“モノクローナル抗体”という語句は特定の抗原と免疫反応し得る唯一種の抗体結合部位を有する抗体を示す。一般にモノクローナル抗体は免疫反応する抗原に対して単一の結合アフィニティーを示す。それゆえモノクローナル抗体には各々異なる抗原に対して免疫特異的な抗体結合部位を多数含む抗体、たとえば二特異的(キメラ)モノクローナル抗体が含まれる。

“実質的に同時”という語句は同時発生的結果、たとえば抗原物質投与と抗CD14抗体、抗LBP抗体、LBPペプチドアナログ、またはこれらの組合せ物の投与の結果として起こる敗血症の症状の軽減または予防などを生じるのに十分な時間以内を意味する。

“医的に許容し得る”という語句は生理的に許容し得る、かつヒトに投与した場合の副作用、めまいなどアレルギーまたは不都合な反応を起こさない分子または組成物に対して使用される。

B. 治療法

本発明は敗血症の1つ以上の症状、特に発熱、低血圧、好中球減少症、白血球減少症、赤血球減少症、ショックおよび多臓器疾患などTNFの血中レベルの一時増加に関連する症状の治療および、または予防に関する。このような治療を必要とする患者にはグラム陰性菌感染、ヘビ毒中毒、肝臓疾患などから生じるエンドトクセミアなどトクセミアの危険にある患者が含まれる。さらに、グラム陽性菌、ウイルスまたは菌類感染した患者も敗血症の症状を示し、本発明の治療の

対象となる。特に本発明から重症を要する患者には大腸菌、ヘモフィラスインフルエンザB (*Haemophilus influenza B*)、ナイセリア meningitidis (*Neisseria meningitidis*)、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) またはニューモコッカス (*pneumococcus*) に感染した患者がある。敗血症の危険にある患者には、火傷、絞による負傷、化学物質による中毒や乱用による腎臓または肝臓障害をもつ患者も含まれる。

したがってある態様では本発明は治療を必要とする患者に治療効果量の抗CD14抗体を投与することにより敗血症の1つ以上の症状を軽減する方法に関する。

“治療効果量”という語句はTNFの血漿レベルの臨床的に有意な上昇を防ぎ、好ましくは少なくとも約30パーセント、より好ましくは少なくとも約50パーセント、最も好ましくは少なくとも約80パーセント減少させるのに十分な量を意味している。活性成分として用いる試薬の好ましい治療効果量にはセクションCで述べられるものが含まれる。

TNFの血漿レベルの臨床的に有意な上昇は少なくとも約25 pg/mlまでの上昇である。血漿TNFレベルの測定法は当分野でよく知られており、ここでは特に好ましい方法について説明する。

健康人または正常な実験動物のTNFレベルはせいぜい約10 pg/mlと見做られ、この値はTNFの最も感度の高い検出限界である。ミシー (Michie) 等、*New Eng. J. Med.* 318: 1481-1486 (1988)；マチソン (Machison) 等、*J. Clin. Invest.* 81: 1925 (1988) およびワーズ (Wage) 等、*Lancet*, 1: 355-357 (1987)。LPSで処理した後のTNFレベルは20倍上昇して400 pg/mlまで到達することが示された。最近、グラム陰性LPS含有メンゴコッカスバクテリアに感染した場合の致死率と血漿TNFレベルの強い相関関係が示された。ワーズ (Wage) 等、*Lancet*, 1: 355-357 (1987)。さらに重症度の敗血症モデルでTNFの同様の増加が示され、これらの変化は致死と直接関係していた。

トレシー (Tracey) 等、*Nature*, 330: 882-884 (1987)。

別の態様においてこの方法には敗血症の危険にあり治療を必要とする患者に治療効果量の抗CD14抗体を、好ましくは単球/マクロファージ系統、好まし

くは単球由来のマクロファージ細胞などの細胞によるインビボにおけるLPS誘導型のTNF分泌を阻止するのに十分な量の抗CD14抗体を投与することが含まれる。

本発明の治療法で使用する抗CD14抗体はアフィニティー精製したポリクローナル抗体であることが好ましい。さらにこの抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。さらにここで用いる抗体CD14抗体分子は抗体分子の Fab、Fab'、P(ab')₂、またはP(v)部分であることが好ましい。

本発明を実施するのに有用なモノクローナル抗体はアシュマン (Ashman) 等 (*Bio. od.* 89: 885-892 (1987)) によって報告された80bおよびバンブーリス (Van Voorhis) 等 (*J. Exp. Med.*, 158: 126-145 (1983)) によって報告されている3C10 (アメリカンタイプカルチャーコレクション登録番号TIB22B、ロックビル、MD) などのハイブリドーマによって生産されるものが好ましい。mAb 80bおよび3C10はハイブリドーマ培養で生成できるが、本発明はこれに限定されるものではない。また本発明は80bおよび、または3C10などのハイブリドーマからクローン化される抗CD14免疫グロブリン発現細胞によって生成するmAbの使用に関する。すなわち、ハイブリドーマ3C10などによって分泌される抗CD14抗体分子を発現する細胞は他の細胞系に移植してトランスフォーマントを生成し得る。このトランスフォーマントは遺伝子型に本発明のハイブリドーマとは異なるが、そのハイブリドーマによって分泌されるものに対応する抗体分子の免疫学的に活性なフラグメントを含む抗CD14抗体分子を生産し得る。たとえばリーディング (Reading) の米国特許4,642,334；ロビンソン (Robinson) 等のPCT刊行物WO 890099；ウィンター (Winter) 等のヨーロッパ特許0289400、キャビリー (Cavilly) 等、ヨーロッパ特許0125023参照。

モノクローナル抗体は上述のハイブリドーマによって生成されるものと同じCD14に対する免疫反応性を示すことが望ましい。ここで用いているように、種々の文法型の“免疫反応性”という言葉は所定量の抗体および所定量のCD14抗原間の免疫反応を50%阻害するのに必要な抗原濃度を示している。すなわち、免疫反応性は、B/B₀値0.5を達成するのに必要な抗原濃度であ

る (ここでB₀は競合する抗原存在下で結合する抗体の最高量であり、Bは競合抗原存在下の結合する抗体量である。B₀およびBはバックグラウンドに同じ補正したものである)。ロバード (Robert)、*Clin. Chem.* 20: 1255-1270 (1974) 参照。

別の態様において、本発明の治療法には治療効果量の抗LBP抗体、好ましくはアフィニティー精製したポリクローナル抗体、より好ましくはmAbを投与することが含まれる。さらに、ここで用いられる抗LBP抗体分子は抗体分子全体のうちの Fab、Fab'、P(ab')₂、またはP(v)部分の形であることが望ましい。投与する抗LBP抗体量は少なくとも敗血症の症状の1つを示す患者のTNFの血中レベルのLBP-LPS複合体によって誘導される臨床的に有意な増加を少なくとも約30パーセント、好ましくは少なくとも80パーセント減少させるのに十分な量であることが好ましい。先に議論したように本方法の恩恵を受ける患者にはグラム陰性菌感染の結果内毒素中毒症を被った患者である。LBPを単離し、抗LBP抗体を誘導する方法は当分野でよく知られている。たとえばトビアス (Tobias) 等、*J. Exp. Med.* 164: 777-793 (1986) 参照。CD14に対するLBP-LPS複合体の結合を阻害し、それによりLBP誘導型のTNF分泌を阻害する抗LBP抗体の能力を測定し、かつ阻害化する方法は当分野でよく知られている。たとえば、実施例16で示した検定法において抗CD14の代わりに抗LBP抗体を用いることができる。

本発明を実施するのに有用な抗LBP抗体はLBPのペプチドアナログと免疫学的に交叉反応する。“LBPペプチドアナログ”とは単球由来のマクロファージの表面に発現するCD14へのLPS-LBP複合体の結合を競争的に阻害し得るポリペプチドである。好ましいLBPペプチドアナログを第1表に示す。

第1表

名称	アミノ酸配列
C16Y	CNRLNRAPQPDELY
Y16C	YTTPEPSELDDDFRC
K16C	KRVADADAPRQYADTC

ポリクローナル抗ポリペプチド抗体の生成法は当分野でよく知られている。ネスター (Nestor) 等、米国特許4,493,795参照。一般に有用な抗体分子の Fab および、またはP(ab')₂部分を含むモノクローナル抗体はここで参考として引用している“抗体、ラポラトリーマニュアル”ハロー (Harlow) およびレーン (Lane) 編、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク (1988) に述べられているハイブリドーマ技術で調製し得る。簡単に云うと、そのモノクローナル抗体組成物を生成するハイブリドーマを形成するためミエローまたは他の自己複製細胞系をCD14またはそのLBP結合部分、またはLBPまたはそのCD14結合部分で高度免疫化した哺乳類の脾臓から得られるリンパ球と融合する。

このミエロー細胞系はリンパ球と同じ種由来のものが好ましい。一般的に、マウス129GIX⁺株が好ましい。本発明に使用するのに適したマウスミエローマには各々名称CRL1580およびCRL1581でアメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックビル、MDから入手し得るヒポキサンチン-アミノプテリン-チミン感受性 (HAT) 細胞系P3×63-Ag8.653およびSp2/0-Ag14がある。

一般に脾細胞はポリエチレングリコール (PEG) 6000を用いてミエローマ細胞と融合する。融合したハイブリドーマはHATに対する感受性で選択する。本発明を実施する上で有用なモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは実施例18に示した方法でCD14またはLBPと免疫反応する能力およびLPS誘導型TNF分泌を阻害する能力を見積ることによって同定する。

本発明で使用するのに有用なモノクローナル抗体は適当な抗原特異性を有する抗体分子を分泌するハイブリドーマを含む培養地からなるモノクローナルハイブリドーマ培養を行なうことで生成し得る。この培養をそのハイブリドーマが培養中に抗体分子を分泌する条件および十分な時間維持する。この抗体含有培養地を回収し、その中に抗体分子を従来の法を用いて単離する。

これらの組成物を調製するのに有用な培養地は当分野でよく知られているもので市販もされており、これらには合成培養地、近交系マウスなどが含まれる。代表的合成培養地には4.5 g/lグルコース、20 mMグルタミンおよび2.5 μg/l

胎児血清を補ったダルベコ最小基盤培地 (DMEM: ダルベコ (Dulbecco) 等, Viro. 8: 396 (1959)) がある。代表的近交系マウスには Balb/c がある。

また、モノクローナル抗ポリペプチド抗体の生成法は当分野でよく知られている。ナイマン (Niman) 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4949-4953 (1983) 参照。一般に、先に述べた抗 CD14 モノクローナル抗体生成操作における免疫原として 1 つ以上の LBP ペプチドアナログを単独、もしくは免疫原キャリアーに結合して使用する。ハイブリドーマを LBP ペプチドアナログおよび LBP と免疫反応する抗体産生能でスクリーニングする。適当な免疫交叉反応を示す mAb による CD14 への LPS-LBP 複合体の結合を阻害能は実施例 16 の検定で確かめる。

別の態様で本発明の治療法には治療効果量の LBP ペプチドアナログ、好ましくは第 1 表で示した配列を有するアナログを投与することが含まれる。

敗血症の症状を示す患者はこれらの症状を予防または軽減する当分野でよく知られた治療法の投与でその恩恵を受けることができる。したがって本発明は敗血症の症状を予防または治療することが知られている様式の治療投与と実質的に同時に治療効果量の抗 CD14 抗体、抗 LBP 抗体、LBP ペプチドアナログ、これらの組合せ物を投与することに関する。たとえば、抗 TNF 抗体および、または TNF アンタゴニストを使用するなど直接的または間接的に敗血症における TNF の役割を阻害することが敗血症の症状を阻止または軽減し得る。特に、トレーシー (Tracey) 等 Nature. 330: 662-664 (1987) によって報告されているものに対応する TNF に対する免疫特異性を有するモノクローナル抗体など活性成分として抗 TNF 抗体を使用することが好ましい。

同様に、本発明の治療法は、さらにコルチゾール、ハイドロコルチゾンなどのステロイドによる実質的に同時の治療を含む得る。

通常、敗血症の症状を示す患者は抗生物質、一般にはゲンタマイシンなどのアミノグリコシドまたはペニシリンやセファロスポリンなどのベータラクタムで治療する。したがって殺菌量の抗生物質を投与すると実質的に同時にここで述べている治療効果量の抗 CD14 抗体、抗 LBP 抗体、LBP ペプチドアナログ、これらの組合せ物を投与する事が好ましい治療法である。“殺菌量”という語句

は治療を受けた患者においてバクテリアを死滅させる血中濃度に達するのに十分な量を意味する。

一般に、ヒトへの投与に関して安全と認識される抗生物質の投与量は当分野でよく知られており、これもよく知られているように抗生物質の種類や治療するバクテリア感染のタイプによって異なる。

好ましい態様において本明細書で述べている抗 CD14 抗体、抗 LBP 抗体、LBP ペプチドアナログ、またはこれらの組合せ物の投与は抗生物質の投与から約 48 時間以内、好ましくは約 12~36 時間以内、最も好ましくは実質的に同時に行なう。

本発明を実施するのに有用な抗生物質には医師デスクレファレンス、ハフ (Huff)、B.B. 編、メディカルエコノミーカンパニー、オラデル、N.J. (1989) に述べられている処方の抗生物質、抗菌物質および消毒剤がある。他の態様において本発明は治療効果量の CD14、好ましくは LPS-LBP 複合体を結合するその可溶性部分を単独もしくは治療効果量の抗 TNF 抗体、抗 LBP 抗体および抗生物質と単独または組合せて投与することに関する。CD14 をコードする cDNA およびこれから誘導されるアミノ酸配列は当分野でよく知られている。ゴヤート (Goyert) 等、Science. 239: 497-500 (1988)、フェレロ (Ferrero) 等、Nuc. Acids Res. 18: 4178 (1988) およびバジル (Bazil) 等、Eur. J. Immunol. 18: 1583-1589 (1988) 参照。

C. 治療組成物

さらに本発明は本発明の治療法を実施するのに有用な治療組成物に関する。本治療組成物には混合物として医薬的に許容可能な賦形剤 (キャリアー) および活性成分として本明細書で述べている抗 CD14 抗体、抗 LBP 抗体および LBP ポリペプチドアナログのうちの 1 つ以上が含まれる。好ましい態様においてこの組成物には LPS-LBP 複合体の CD14 への結合を阻害し得る抗 CD14 mAb が含まれる。好ましい mAb は 80 b であり、より好ましいものには 3C10 がある。

他の好ましい態様における組成物には、LPS-LBP 複合体の CD14 への結合を阻害する抗 LBP 抗体、好ましくは mAb が含まれる。第 1 表に示した配

列を有する LBP ペプチドアナログと免疫反応する抗 LBP 抗体を含む組成物が特に好ましい。

また好ましい態様の 1 つには CD14 への結合に関して LPS-LBP 複合体へのアンタゴニストとして働く LBP ペプチドアナログが含まれる。本発明の組成物に使用する上で好ましい LBP ペプチドアナログは第 1 表に示した配列を有するものである。

さらに、好ましい治療組成物には以下の活性成分: 抗生物質、ステロイドおよび抗 TNF 抗体および TNF アンタゴニストのうちの 1 つ以上が含まれる。代表的処方を以下に示す。

(処方 A)

成分	投与量 (mg/ml)
ゲンタマイシン (硫酸塩)	40
抗 CD14 (mAb 3C10)	10
重碳酸ナトリウム USP	3.2
EDTA ナトリウム塩 USP	0.1
注射用水 q. s. s. d.	1.0 ml

(処方 B)

成分	投与量 (mg/ml)
抗 TNF 抗体	10
抗 CD14 (mAb 3C10)	10
重碳酸ナトリウム USP	3.2
EDTA ナトリウム塩 USP	0.1
注射用水 q. s. s. d.	1.0 ml

(処方 C)

成分	投与量 (mg/ml)
ゲンタマイシン (硫酸塩)	40

抗 TNF 抗体	10
抗 CD14 (mAb 3C10)	10
重碳酸ナトリウム USP	3.2
EDTA ナトリウム塩 USP	0.1
注射用水 q. s. s. d.	1.0 ml

別の態様において本発明は医薬的に許容し得るキャリアー中、CD14 またはその LBP 結合可溶性部分を含む敗血症治療に有用な治療組成物に関する。さらにこの組成物には治療効果量の抗 TNF 抗体、抗 LBP 抗体および抗生物質のうちの 1 つ以上が含まれることが望ましい。

活性成分としてポリペプチドまたは抗体分子を含む治療組成物の調製は当分野でよく知られている。一般にはそのような組成物は溶液やサスペンションなど注射可能な形で調製されるが、凍結化、サスペンション化、液体化に達した固体も調製し得る。またエマルジョンも調製される。活性治療成分を医薬的に許容可能で、かつ活性成分に適合する賦形剤と混合することがよくある。たとえば適当な賦形剤には水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、やその組合せ物がある。さらに望ましい場合は活性成分の効果を高める保護またはエマルジョン剤、pH 緩衝剤など少量の補助剤が含まれる。

ポリペプチドまたは抗体は中和した医薬的に許容可能な塩として治療組成物に処方される。医薬的に許容可能な塩には酸付加塩 (ポリペプチドまたは抗体分子の遊離したアミノ基と形成される。) が含まれ、これはたとえば硫酸塩やリン酸塩などの無機塩または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸で形成される。また遊離のカルボキシル基で形成される塩は、たとえばナトリウム、カルシウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化鉄などの無機塩およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基で誘導することができる。

治療用のポリペプチドまたは抗体含有組成物は従来たとえば注射により静脈に単位投与量が投与される。本発明の治療組成物に関して使用する“単位投与量”という言葉はヒトに一回投与するのに適した物理的に独立した単位で、そのま

特表平5-501399 (B)

が必要とされる希釈剤、すなわちキャリアーまたはベヒクルと共に所望される治療効果を得るに計算された所定量の活性成分を含むものを意味する。

この組成物は投与模式に適合する方法で治療効果量が投与される。投与量は治療を受ける個体、活性成分を利用する個体の免疫系の能力および所望されるCD 14またはLPS-LBP複合体結合能の阻害または中和の程度に依存する。投与に必要とされる活性成分の詳細な量は担当医の判断に依存し各々の患者によって異なる。しかし適当な投与量範囲は1日あたり体重1キログラム当たり活性成分0.1〜20、好ましくは約0.5〜約10、より好ましくは1〜数ミリグラムのオーダーでありそれらは投与の経路にも依存する。初期投与や二次投与に関する適当な投与模式も種々であるが初期投与について次の注射または他の投与方法で1時間以上の間隔をあけて反復して投与するのが一般的である。それとは別に、血中に10ナノモル〜10マイクロモル濃度が維持されるような連続的静脈内注入も使用される。

本明細書で使用している“pg”はピコグラム、“ng”はナノグラム、“μg”はマイクログラム、“mg”はミリグラム、“μg”はマイクロリットル、“mL”はミリリットル、“L”はリットルを意味する。

(実施例)

以下に示す実施例は本発明を説明するものであり、これを制限するものではない。

実施例1〜11は単球/マクロファージ系統のヒト細胞が膜面上を動く細胞表面レセプターを介してLPS-LBP複合体を結合することを明確にした実験を示している。

実施例12は抗CD 14抗体がLPS-LBP複合体のCD 14への結合を特異的に阻害することを示している。

実施例13〜15はCD 14がLPS-LBP複合体と特異的に結合し、かつその結合がMO由来のTNF分泌を誘導することを示している。

実施例16は抗CD 14 mAbがヒト血液におけるLPS-LBP複合体が誘導するTNFの分泌を阻害することを示している。

実施例17は実施例1〜16の結果のまとめおよび議論を提供している。

1. 試薬

精製したヒトの単球を培養することによって得た。単球の新鮮な単球は37℃で45分間、末梢血液単球細胞がたんに質コート化プラスチックに粘着させることにより得た。PMNはイングリッシュ (English) 等、J. Immunol. Methods, 5: 249 (1974) の方法により新鮮な血液から精製した。赤血球でロゼット形成させることにより精製したT細胞はJ. ミング (Ming) (ロックフェラー大学) から提供された。ヒトのヘソの静脈内皮細胞単層 (Lo) 等、J. Exp. Med., 169: 1779-1793 (1989) はS. K. (Lo) (ロックフェラー大学) 博士から提供された。ヒツジ赤血球 (E) はライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164 (1982) に示された方法を用いて1gG (E1gG) または1gM (E1gM) でコートした。

C3bは10% C5-欠損ヒト血清 (シグマ) 1mL中37℃で30分間2〜10×10⁶ のE1gMをインキュベートすることによりE1gMを付着させた。それからこの赤血球を洗浄し、ついで2.5mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むバッファ中、0℃で10分間インキュベーションした。生成したEC3bはEDTA阻性のMOとのロゼット形成による検定で示されるようにC3bを有していない。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888 (1986) に従ってEをLPSでコートした。調整に用いたLPS量を変化させてE LPS¹⁰ (1〜10 μg / 4×10⁶ E) またはE LPS¹⁰⁰ (0.2〜1 μg / 4×10⁶ E) が生成した。等容量のE LPS¹⁰ (10⁶ / mL) およびLBP 10 μg / mL を37℃、20分間インキュベーションすることによりE LPS¹⁰ をLBPでコートした。生成したLBPコートE LPS (リガンドコートE) は洗浄し、直ちに使用した。

いくつかの実験ではEを別の方法でLBPコートした。まず5×10⁶ のEを0.1M炭酸ナトリウムpH 9.2中5℃で20分間2.50 μg のスルホ-NHS-ビオチンとインキュベーションすることによりEをビオチン化し、また50 μg のLBPを5 μg のスルホ-NHS-ビオチンとインキュベーションすることによりLBPをビオチン化した後PBSに於て透析した。このビオチン化したたんぱく質はストレプトアビジンブリッジを介してビオチン化Eに結合させた。洗浄した10⁶ 個のビオチン化E (EB) を20℃で30分間10 μg のストレプトアビジンとインキュベーションしてアビジンコート赤血球 (BBAV) を生成した。フルオレセイン化ストレプトアビジンを用いた予備実験はE BAVが

LBPは急性状態のウサギ血清から精製した (トビアス (Tobias) 等、J. Exp. Med., 164: 777-783 (1986))。これは順色ゲル上では均一であると考えられる。抗ウサギLBPはヤギで調製した。MBPはR. A. B. エズコビッツ (Ezekowitz) 博士 (ボストン, MA) から提供された。取組/遊走促進因子 (BPI) はJ. ガベイ (Gabay) 博士 (ニューヨーク, NY) から提供された。サルモネラミネータ (Salmonella minnesota) のLPS (Re595 または野生型) はリストバイオロジカル (キャンベル, CA) から入手した。CD 18に対するモノクローナル抗体 (mAb) IB4およびFcγR III (CD 16) に対するmAb、3G8はライト (Wright) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 5699-5703 (1983) に報告されている。CR 1に対するmAb 543はR. シュレーパー (Schreiber) (セントルイス, MO) から提供され、FcγR IおよびFcγR IIに対するmAb 22およびVI、3はM. ファンガー (Fanger) (ハノーバー, NH) から提供された。パイロジェンフリーのヒト血清アルブミン (HSA) はアーマーファーマシューティカルズから入手し、また、パイロジェンフリーのPBSおよびDGV B⁺はホワイテカー-M Aバイオプロダクツから入手した。NHS-ビオチン、スルホ-NHS-ビオチンおよびストレプトアビジンはピエスケイカルから入手した。

2. 装置

組織培養用プラスチック表面は20℃で1時間、LPS 1 μg / mLあたり25 μg / mLたんぱく質 (抗体、LBP、またはHSA) または1 (μg / mL) とインキュベーションすることでコーティングした。免疫複合体を形成するため、HSAコート表面をさらに30分間HSA抗血清 (1:50) とインキュベーションした。ある場合には、ついでLPSコート表面を20℃で30分間、10 μg / mLのLBPで処理した。過酸化水素生成の検定のためには全てのコート化表面を食細胞添加の前、1時間、1ミリグラム / ミリリットル (mg / mL) HSAで処理した。コート化した表面は検定前パイロジェンフリーのPBSで注意深く洗浄した。

3. 細胞

単球由来のマクロファージ (MO) はライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164 (1982) に報告されている方法に従って3〜10日間テロンビーカー中で

一で強い蛍光性を有し、かつ凝集が見られないことを示した。洗浄した2.5×10⁶ 個のE BAVを20℃で30分間、2.5 μg のビオチン化LBPとインキュベーションしてE BAV-LBPを生成した。

ガラクトースの存在下または非存在下でサルモネラチフィリウム (Salmonella typhimurium) LT 2 G₈ Eを増殖させ、それぞれ完全な、または短縮したLPSを含む細胞を得た。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888 (1986)。対数増殖培養物を洗浄し、フルオレセインでラベル化した後PBSで2×10⁶ / ミクロリットル (μL) に調整した。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888 (1986)。

4. 検定

LPSコート赤血球の懸液 (実施例3) は丸窓マイクロプレート中21℃で30分間希釈LBP 10 μg / mL中の10⁶ 個のE LPS¹⁰ を調とうすることにより測定した。凝集は比濁パターンから読み取った。

MOへのリガンドコートEの結合をライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164 (1982) の方法で測定した (実施例3)。簡単に云うとテラサキ (Terasaki) 組織培養プレートにHSAまたは他のたんぱく質でコートし (実施例2)、ついで3mMグルコース、0.5 mg / mL HSAおよび0.3 μg / mLアブソチニン (シグマ) を含むPBS中の5 μg の細胞 (0.5×10⁶ / mL) を37℃で、45分間インキュベーションすることによりMOの単層を形成した。この単層にリガンドコートEおよび指示たんぱく質を添加した。Eを0℃、10分間かけて比濁させ、ついでそのプレートを37℃に15分間維持した。洗浄して未吸着のEを除いた後比濁測定装置で吸着を測定した。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888 (1986) に示されているように37℃、15分間のインキュベーションを採用した同様の方法でフルオレセイン化サルモネラ (Salmonella) の結合を測定した。この結果は100個のMO当りのEまたはバクテリアの数を示す吸着指数として報告する。37℃で45分間MOをEとインキュベーションし、かつウェルを測定する前、低濃度で遊星に処理することにより未吸着Eを分解すること以外は同様の方法により (ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164 (1982)) リガンドコート化Eの食作用を測定した。

5. LBPは赤血球膜へ挿入したLPSに結合する。

0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLBPのELPS¹¹への添加が凝集を起こした。リン脂質との疎水性相互作用によりEの膜へのLPSが分配されるので、この凝集結果はLBPがリビドAの露出した親水性部分を認識し、かつ、LBPが多量体形成する能力を有することを示している。ELPSは強く凝集せず、緩やかなビベティングで分散し得る。

6. LBPはELPSおよびサルモネラのマクロファージへの結合を増進する。

LPSと白血球上のレセプターのCD18複合体とLPSとの相互作用を介してグラム陰性菌およびLPSコート化赤血球はMOと結合する。ライト(Wright)等、J. Exp. Med., 164:1878-1888(1986)。その相互作用を乱すLBPの能力を調べた。最初の実験は高レベルのLPSで調製したEを使用した。これらのELPS¹¹はMOに強力に結合し、LBPの添加は結合をわずかに促進させた。この促進の性質を試験するため、低レベルのLPSでEを調製した。5マイクログラム/ミリリットル ($\mu\text{g}/\text{ml}$) LBPの存在下または非存在下単層のMOをELPS¹¹とインキュベーションした。ELPS¹¹はMOとほとんど結合しなかったが、LBPの添加で結合が劇的に促進された(第1図)。結合の増進は1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LBPで効果が最も大きくなる反量依存性を示す。この効果の特異性は他の急性炎症反応、マンノース結合たんぱく質が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でもELPS¹¹のMOへの結合に影響せず、別のLPS結合たんぱく質BPIは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でもその結合に影響せず、またポリクローナル抗LBP抗血清(1:200)がLBPによって起こるELPS¹¹のロゼット形成を20倍も減少させるという観察によって支持されている。

また、MOとELPSとの相互作用を促進するLBPの能力は赤血球膜中のLPS量に依存していた(第2図)。LBPはELPSとMOとの直接的相互作用を維持するのに必要な量よりも20~100倍も少ないLPS量で調製したEの結合を効果的に伸介し得る。

短縮型LPSを発現するグラム陰性菌の株(ラフ株)はMOと強力に結合するが、完全なLPSを有するスムーズ株はあまり結合しない。ライト(Wright)等、J. Exp. Med., 164:1878-1888(1986)。LBPはスムーズおよびラフLPSと等しく

良く結合するので[トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem., 264:10367-10371(1989)]スムーズサルモネラ(Salmonella)へのLBPのオプソニン作用を調べた。第2表のデータが示すように、LBPの添加がスムーズサルモネラ(Salmonella)のMOへの結合を強く促進させた。

第2表

LBPはサルモネラのMO¹への結合を促進する。

吸着指数

	スムーズS, チフィリウム	ラフS, チフィリウム
-LBP	273	1088
+LBP	1661	2,109

1. S. チフィリウム(Typhimurium) LT2のスムーズおよびラフ型調製物はライト(Wright)等、J. Exp. Med., 164:1878-1888(1986)に報告されているようにガラクトースの存在下または非存在下でこの株のGalE変異株を増殖することにより得た。

マクロファージ単層へのバクテリアの結合は2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLBPの存在下または非存在下で測定した。スムーズ型バクテリアのMOへの結合に関しLBPの添加は5.9 \pm 1.9 (n=4) 倍の増加を起した。第2表はLBPの添加もラフ型サルモネラ(Salmonella)の結合を促進するがその効果はオプソニン化していないバクテリアの強い結合によりスムーズ型S. チフィリウム(Typhimurium)で見られるものよりも著しく小さいことを示している。したがって、LBPは生きている本来のバクテリアのMOとの相互作用を促進させる。

7. MOはLBPのLPSとの複合体を認識する。

実験例8において、LBPをMOおよびELPSと一緒にした。LBPがMOまたはELPSと結合するかどうかを測定するため、細胞を別々にLBPとインキュベートし、洗浄後それらを合わせた。この実験を第3表に示す。

第3表

ELPSのLBPによる前処理はそれらの相互作用を促進するがMOには促進が見られない。¹

吸着指数

条 件	実験1	実験2	実験3
LBPなし	0	17	4
前処理ELPS ¹¹	820	715	942
前処理MO	5	21	18
LPB, ELPS ¹¹ 及びMOの3成分混合物	628	520	788

1. 単層のMOへのELPS¹¹の結合は実験例4に示した方法で測定した(0.2 $\mu\text{g}/4 \times 10^4$ E)。ELPS¹¹またはMOを37℃で20分間5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で前処理し決定前に洗浄した。別に吸着決定の際に5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LBPを添加した。

ELPS¹¹のLBPによる前処理はコインキュベーション実験で観察されるものと同じ(データを示す)殺菌・応答細胞に促がいMOへの結合を強く促進した(第3表)。この結果はLBPはELPSと安定に会合し、かつ表面に結合したLBPはMOによって認識されることを示している。一方MOの前処理はつづくELPSの結合に影響しなかった(第3表)。

ELPS表面のLBPはLPSと複合体を形成する。LPSの非存在下MOがLBPと結合するかどうかを測定するため、LBPをビオチン化し、ストレプトアビジンコート化赤血球に結合した。生成したEBAV-LBPはMOとは結合しないが(第3図)、LPSの添加はELBPのMOへの強い吸着を引き起こした。ELBPの吸着を引き起こすのに必要なLPS量はE欠失LBPの吸着に必要な量よりも50倍も少ないことから(第3図)、LPSはLBPへの結合によりEBAV-LBPの結合を促進させるように思われる。さらに、LPS処理ELBPはCD18欠失MOに強く結合するが、ELPSはこれと結合しない。したがって、LPはMOによって認識されるためにはLPSと複合体を形成しなければならない。

8. LBPは単核食細胞に限定される移動性レセプターによって認識される。

LBP処理ELPSは単層およびMOと實質的に100%結合する。このこと

は結合活性がこれらの集団の全てのメンバーに存在することを示している。LBPが他のタイプの細胞と相互作用するかどうかを決定するため、単層のPMN、T細胞、およびヘソの脾臓内皮細胞をLBP処理したELPS¹¹とインキュベートした。結合は観察されなかった。同様に、たまたまMO調製物に導入したリンパ球がLBPコート化Eと結合することは決して観察されなかった。したがって、LBPコート化粒子を結合する能力は単核食細胞に限定された性質であると思われる。

LBPに対する特異的なレセプターの存在がLPSおよびLBPの複合体でコートした表面上にMOを吸着させることで示された。第4表は表面結合したLBPはLBP処理したELPSの結合を強く低下させるがE1gGまたはEC3b1の結合にはなんの影響も持たないことを示している。

第4表

LBPのレセプターは膜面中を移動する。¹

表面	ELPS ¹¹ LBP	ELPS ¹¹	EC3b1	E1gG
HSA	833	507	915	621
HSA-抗-HSA	795	455	1051	45
IB4	846	149	200	253
LPS-LBP	147	828	1181	762

Lプラスチック表面を21℃で2時間HSA(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、mAbIB4(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)またはLPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)でコートし、ついで十分に洗浄した。指示されている場合は、抗-HSA(ウサギ抗HSA抗血清の1:40希釈液)またはLBP(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を加え、20℃で30分間インキュベートした。MOを37℃で45分間洗浄したコート化表面上に吸着させ、さらに洗浄した後、リガンドコート化赤血球を添加した。3 μg LPS/ 4×10^4 Eを用いてELPS¹¹を調製した。ELPS¹¹は実験例3に示したように0.3 μg LPS/ 4×10^4 Eで調製し、つづいて5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLBPで処理した。示したデータは4回の実験の代表値である。

特表平5-501399 (8)

上述の結果はLBPが膜中を移動する分子によって認識されることを示しており、このレセプターはCR3およびFcRとは異なることを示している。
 8. LBPはCR3またはFcRとは相互作用しない。

LPSはCR3やCD18複合体の他のメンバー (LFA-1およびp150, 95) によって認識されることが知られているので (ライト(Wright)等, J. Exp. Med., 187:1879-1889(1988)), これらのレセプターと少量のELPSの相互作用を容易にすることによりLBPがELPSの結合を促進させるらしい。しかし、いくつかの観察結果はこの可能性を排除した。第V表の結果はLBPがCD18の先天性欠損患者2人から単離した単球へのELPSの強い結合を引き起こすことを示している。CD18欠損細胞は平行した検定でELPS⁺またはEC3b1とほとんど結合しなかった。

第5表

LBPはCD18欠損患者由来の単球へのELPS⁺の結合を仲介する。

検体	吸着指数		
	ELPS ⁺	ELPS ⁺	ELPS ⁺ +LBP
EC3b1			
コントロール1	108	31	282
128			
コントロール2	185	27	437
182			
患者1	17	15	394 4
患者2	5	14	528 16

1. 2人のCD18欠損患者の単球の単層 (CD18欠損白血球はインビトロでLPSに反応する) および2人の正常な成人コントロールをEC3b1, ELPS⁺ (3 μg / 4 × 10⁶ E), ELPS⁺ (1 μg / 4 × 10⁶ E), とインキュベートし、その吸着指数を測定した。指示されている場合は、ELPS⁺に2.5 μg / mlのLBPを添加した。

た。並行した実験でEC3b1の強いフィブロネクチン-およびPMA-刺激した食作用が示された。LBP仲介食作用が無いことの説明は赤血球表面のLPSの著しい膜方向への移動である。LPSはMOに吸着するEの極に“キャップ”をしてEの内層上のリガンドを不十分なものにし、シュードゴドに誘導する。このキャッピングを防ぐため、ビオチン化したLBPを第4図で示した方法でビオチン化したEたんばく質に結合させる。ここでも、このような結合を受けたEはEコート化した膜またはPMA刺激MOのいずれによっても貪食されることはなかった (貪食指数=0)。並行した実験では抗CD18 mAb (1B4) のビオチン化F (a b), によって容易に貪食されることが示された (貪食指数=4.82)。したがって、LBPのレセプターはそれ自身ではコート化赤血球の貪食作用を開始できない。

11. LBPのレセプターは膜化刺激を開始しない。
 LBPとそのレセプターの相互作用がMOからの細胞毒性応答を開始するかどうかを決めるため、コート化表面とMOとの相互作用の際の過酸化水素の生産を測定した。

コート化表面のMOの粒数の間の過酸化水素の放出をデラハルプ (de la Harpe) 等, J. Immunol. Methods, 78:323-338 (1985) の方法で測定した。簡単に云うと、3~4 × 10⁶ 個のMO (3日または4日目) をホースラディッシュペロキシダーゼおよび4.2 mmole のスコポレチンを入れたたんばく質コート化組織培養ウェルに添加した。このプレートを37℃でインキュベートし、間隔をおいて自動蛍光プレートリーダーを用いてスコポレチンの消費を測定した。3個のウェルの平均を結果としてウェル毎に生産される過酸化水のmmole 数で表わした。コントロール刺激物、PMA (100 ng / ml) の添加ではテストした全てのコート化表面に関して同じ速度、同じ程度の過酸化水の迅速な発生が起った。

第5図は、LPSコート化表面へのMOの結合がわずかな過酸化水の放出を起すことを示している (免疫複合体またはPMAによる刺激の12%)。しかし、LBPでコートした表面は基底量以上の過酸化水の放出はなかった。さらに、LPSコート化表面へのLBPの添加はLPSによる放出をブロックし、

LBP処理ELPS⁺の認識にCD18が関与している証拠はCD18を抗CD18 mAbでコートした表面に吸着ることによりMOの頂点表面からCD18分子を放出させる実験から得られる。

Ma1B4はEC3b1およびELPS⁺の結合の減少によって示されるようにCD18分子を減少させるが、LBP処理ELPS⁺はこれらの細胞に正常に結合する (第4表)。最後にCa⁺⁺およびMg⁺⁺の欠失はEC3b1およびLPSのCD18複合体の結合を完全にブロックする (ライト(Wright)等, J. Exp. Med., 156:1149-1164(1982) およびライト(Wright)等, J. Exp. Med., 164:1876-1888(1986))。EDTA含有バッファにおけるLBP処理ELPS⁺の結合は等しかった。

LBP認識におけるFcレセプターの関与も除外された。E1gGの結合により決定されるように免疫複合体コート化表面上の細胞の粒数がFcレセプターを著しく減少させる。しかし、LBPコート化ELPS⁺の結合は変化しなかった (第4表)。同様の実験で表面結合マンノース結合たんばく質、FcR1, FcR2, FcR3に対する表面結合mAbおよびCR1はLBPのMOへの結合に影響しないことが示された。これらのデータはLBPがCR1, CR3, FcRまたはマンノース結合たんばく質レセプターによって認識されないことを示している。

10. LBPのレセプターはFc仲介の食作用を促進する。

抗E1gGの添加はLBPコート化ELPS⁺のMOによる食作用を著しく強める (第4図)。最大の食作用の半分を起すのに必要な抗E1gGの投与量はLBPコート化Eの食作用を起すのに必要な量よりも5倍も少ない。このようにLBPは食作用応答の誘導にE1gGと相乗的に作用するように思われる。先の報告に従うと (アーレンバーガー (Ehlenberger) 等, J. Exp. Med., 145:357-371 (1977))、EへのEC3b1の吸着はE1gGに仲介される食作用を促進し、またこの促進度はLBPによるものと同等である (第4図)。

LBPのみに仲介される食作用も調べた。LBPコート化ELPSはMOときれいなロゼットを形成するが、結合したEはいずれも残存 (第4図)、フィブロネクチン、またはPMA-刺激MOのどれによっても貪食されなかった。

このことはLBPがこの実験系でLPSと効率よく相互作用していることを示している。並行した実験でLBPまたはLPS+LBPコート化表面上のMOの粒数がLBP処理ELPS⁺の結合を減少させることが示された。このことでLBPレセプターの結合が起きていることが認められた。したがって、LBPレセプターは膜化刺激を開始できないと考えられる。

12. 抗CD14抗体によるLPS-LBP複合体のMOへの結合の阻害。
 MOへのLPS-LBP複合体の結合を阻害する3つの抗CD14 mAbの能力を測定した。単層のヒトMOを0で15分間、それぞれ0 μg/ml, 0.15 μg/ml, 0.5 μg/ml, 1.5 μg/ml, 5 μg/ml, および15 μg/ml濃度のmAb 3C10, 80bまたは2b1cとインキュベートした。この単層がLBP処理ELPS⁺ (実験例3) と結合する能力を実験例4に示した方法で決定した。

第6図に示したこの実験結果は、mAb 3C10および80bは使用したmAb濃度を増加させるにつれ減少する吸着指数を示し、一方、mAb 3C10および80bが認識するものと異なるエピトープを認識するmAb 2b1cはコントロールmAb濃度 (0 μg/ml) で得られるレベルより低い指数に減少させることはできない。すなわち結合を阻害することはできなかった。このようにmAb 3C10および80bはMOへのLPS-LBP複合体の結合を阻害する能力を有する。この阻害の特異性は、CD11b, CD18, CD18およびHLAに対する抗体は結合を阻害しないことによって支持される (データ未示)。

一方、第7図ではmAb 2b1c, 3C10および80bが全てMOへのLPS-LBP複合体の結合を減少させることを示している。MO単層を作る前にモノクローナル抗体を組織培養プレートに固定した。このことは、プレートに25 μgたんばく質/mlの濃度のmAbを加え、MOを接種する前に未結合のmAbをプレートから洗い落とすことによって行った。抗CD14 mAbでコートした表面に吸着したMOはLPS-LBP複合体でコートした赤血球の結合を減少させたが、他のmAbは減少させなかった。このように吸着したマクロマージの基底表面に再分布したCD14がLPS-LBP複合体の結合に必要であ

る。この結果はCD14がLPS-LBP複合体のレセプターとして働くという第6図の結論を確認している。

13. CD14はLPS-LBP複合体と特異的に結合する。

LPS-LBP複合体と特異的に結合する精製CD14の能力を測定した。表面をまず抗CD14のAbでコートし、ついで単球のTriton X-100 抽出物でコートすることによりCD14をそれに固定した。10⁶個の単球を1% Triton PBS溶液に懸濁し、0℃で15分間インキュベーションした後不溶性物質を遠心で除いた。CD14を含む抽出物を抗体コート化表面と接触させた。この操作でCD14でコートした表面ができる。CD14以外の抗原に対する抗体を含むコントロールウェルではこの操作でCD14以外のたんぱく質でコートした表面ができる。十分洗浄した後LPS-LBP複合体でコートした赤血球をコート化ウェルに入れ、その赤血球(LPS⁺)の吸着を写真に撮った。LPS-LBP結合部位に対する結合部位をブロックしないCD14に対する抗体mAb 2b1cにより表面に吸着したCD14はコート化赤血球に強く結合した。他の抗原でコートした表面はこの活性を示さなかった。このように、精製したCD14分子はLPS-LBP複合体を結合する能力を有する。この観点でCD14がLPS-LBP複合体のレセプターとして働いていることが確認された。

14. LPS-LBP複合体はMOにおけるTNFの分泌を誘導する。

LBP、加熱処理LBP、ウシ血清アルブミン(BSA)またはウシ胎児血清(FCS)の存在下、腹腔洗浄性マクロファージ(PFM)におけるTNF分泌を誘導するLPSの能力を測定した。

ウサギのPFMを得るため、NZWウサギ(2~2.5kg)にBCG(BCG細胞株、R-200、リビウム/ケムリサーチ社、ハミルトン、MT)由来の細胞株を10⁶gを含む35ミネラルオイル(ドラグオール bVR、パンレコ、パトラ、PA)を腹腔内注射した。3日後、ペントバルビタールナトリウム(ウェスタンメディカルサプライ社、アルカディア、CA)120mgの静脈注射を行い、ついで2mM L-グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウム、50 U/50⁶g ペニシリン/ストレプトマイシン/ml、10mM ヘベス、2%ウ

的に定量した。検定結果はU/mlで表わした。1ユニット(U)は50%の細胞を溶解するTNT量と定義する。

検定にはルーチンに8~12個のプレートを作る。各プレートには2つのコントロール、Re 595 LPS処理RAW264.7細胞のならし培養地(8×10⁶ U/ml)およびRe 595 LPS処理ウサギPFMのならし培養地(1.3×10⁶ U/ml)を含めた。これらのコントロールはヒト細胞誘導TNF(シタス社、エミリービル、CA、2×10⁶ U/ml)に対して校正し、それに従って検定結果を標準化した。サンプルは4回検定し、その変動係数は0.12±0.08 (SD)であった。この検定法を用いて10pg/ml程度のウサギマクロファージ由来TNFが検出できる(比活性1×10⁶ U/mg)。しかし、10%以上の血清濃度はL929細胞の非特異的ラウンディングおよび粘着のロスを起こすので、血清中のウサギTNFの検出限界は20 U/ml(0.2ng TNF/mlに相当)である。第8図に示したこの実験結果は、LPSおよび活性LBPの両方が存在する場合のみTNFが生成されることを示している。Re 595 LPSはサルモネラ(Salmonella)のラフ株由来のものである。大腸菌O111:B4由来のLPSなどスムーズ菌株から単離したLPSを用いた場合も同様の結果が得られ、このことはこの効果の一般性を示している。

15. LBPへのLPSの結合はLBPをトリプシン切断から保護する。

50mMヘベス、10mMEDTA、pH7.4を含むバッファ中最終濃度0.3mg/mlのLBPを含むサンプルを調製した。

1つのサンプルに対して最終濃度0.125mg/mlとなるようにLPSを加えた。第2のサンプルには最終濃度が0.125mg/mlとなるように硫酸デキストリンを加えた。ついで3個全てのサンプルに最終濃度2⁶g/mlとなるようにトリプシンを加えた。37℃に維持しながら、5、25、60および120分の時間間隔で部分標本を採取した。この部分標本は12%ゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析した。第9図に示すこの実験結果は、LBPのLPSによる結合が酵素分解からLBP保護することを示している。LPSは切断を防ぐLBPの構造変化または切断部位への立体障害を誘導することによりLBPを保護する。

シ胎児血清、および5 U/mlヘベリンを補った500mlの希釈RPMI-1640による腹腔の無菌的洗浄を行った。収獲した細胞を遠心し(1000×G、10分、4℃)、をFBSを含まない上記培養地(無血清培養地)に懸濁した。さらに遠心と無血清培養地への懸濁を行った後、その細胞をヘモサイトメーターを用いて計数し、8~10×10⁶ マクロファージ/フラスコの密度になるように150mlフラスコにプレーティングした。37℃、5%CO₂で2時間後、激しい洗浄と20mlの無血清培養地の補充により非粘着細胞を除去した。ライト染色した細胞遠心調製物を用いて調べた時、ミネラルオイル誘導型の腹腔洗浄細胞には約60%のマクロファージ、35%の好中球、および5%の白血球が含まれていた。プレーティングと洗浄後、粘着細胞の90%以上がマクロファージとなった。このように生成したウサギPFMを12時間、先に示したたんぱく質の存在下および非存在下、サルモネラミネソタ(Salmonella minnesota) Re 595から単離したLPS(100 pg/ml)で処理し、その細胞上清をマチソン(Matison) 等、J. Clin. Invest., 81:1925 (1988) に述べられているラフ(Ruff) 等、Lymphokines, 2:235-242 (1981) のL929検定法の修正法を用いて上述のようにTNFを検定した。

簡単に言うと、L929細胞(CCL1、アメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックビル、MD)を10mMヘベスおよび10%ウシ胎児血清を補ったRPMI 1640 (ハイクロン、レバティン(Rehatin) F, S,、レヘスケミカル社、フェニックス、AZ)で培養した。この集密培養物を5mMEDTAおよび10mMヘベスを含む生理食塩水中0.5%トリプシン(TRL3、ワシントンバイオケミカル社、フリーホルム、NJ)溶液で簡単にすすぎ、アクチノマイシンD(1⁶g/ml)を含む新鮮な培養地に懸濁した後96穴プレートに入れた(5~7×10⁶ 細胞/ウェル)。培養2時間後、順次希釈したサンプルをウェルに加え、そのウェルに0.2%クリスタルバイオレット、10%ホルマリンおよび0.01Mリン酸pH7~7.5からなる溶液を滴した。ついで水で十分洗浄した後ウェルを乾燥させた。読解度はIBM-PCコンピュターを備えたBio-TekモデルEL510プレートリーダー(Bio-Tekインスツルメント、バーリントン、VT)を用いて分光学

16. ヒト血液において抗CD14モノクローナル抗体はLPS-LBP誘導型のTNF生産を阻害する。

ヒト血液中において抗CD14mAbがMOによるTNF分泌を阻害する能力をエズベック(Espevik)等、J. Immunol. Meth., 95:99-105 (1988) に報告されているTNF誘導性細胞毒性検定法を用いて測定した。簡単に言うと、ヘパリンで抗凝集処理したヒト血液を調製し、37℃で30分間、最終濃度1⁶g/mlとなるようなmAb3C10、60bまたは1B4とインキュベーションした。ついで、この細胞を37℃、12時間、加温、10%CO₂インキュベーター中で最終濃度0、0.01、0.1、または1.0ng/mlのRe 595 LPSとインキュベーションした。それから各サンプルの血液を採取しTNFの存在を検定した。

これらの実験では、健康な被験体の血液中の機能的LBPレベルが100~250ng/mlと見られるため、さらにLBPを添加する必要はない。トビアス(Tobias) 等、J. Exp. Med., 164:777 (1986) およびトビアス(Tobias) 等、Infect. Immun., 50:73-76 (1985)。LBPに対するLPSのアフィニティーの見積もりに基づき、(トビアス(Tobias) 等、J. Biol. Chem., 264:10867-10871 (1989))、LBPの機能的レベルは添加した全てのLPSと結合するのに十分な量である。

WEH1クローン13細胞はトロントヘイム大学のT、エズベック(Espevik)から提供され、10%FCS、0.1mMグルタミンおよび30⁶g/mlゲンタマイシンを含むRPMI 1640培養地(ギブコ)で培養した。この細胞をRPMI 1640培養地100⁶l中2×10⁶個となるようにマイクロプレートのウェルに接種した。ついでMO培養上清5~50マイクロリットル(μl)のサンプルをWEH1クローン13細胞培養地に加え、37℃で20時間インキュベーションした。ついでPBS中5mg/ml濃度のMTTテトラゾリウム(M-2128シグマケミカル、セントルイス、MO)10マイクロリットルを各ウェルに添加し、さらにそのウェルを37℃で4時間インキュベートした。ウェルから上清100マイクロリットルを吸引した後、0.04NHCNを含むイソプロパノール100マイクロリットルを各ウェルに添加し

た。融育のホルマザン結晶を溶解した後、そのプレートにテスト液を570nmおよび参照波長630nmを用いたマイクロプレートリーダーでプレートの測定を行った。

死細胞の割合は以下のように算出した。

$$100 - \frac{\text{CP/TNPを含むウェルの光学密度}}{\text{コントロールウェルの光学密度}} \times 100$$

実験培養で得られる死細胞の割合を種々の既知の濃度のTNPで得られた割合と比較して各実験培養中のTNP濃度を測定した。この実験結果を第8表に示す。

第8表

ヒト血液におけるLPS誘導TNF生産に関するモノクローナル抗体の効果。

(Re 595 LPS), ng/ml	抗体	(TNF), U/ml
-	-	<0.5
0.01	-	<0.5
0.1	-	4.8
1.0	-	3.8
-	3C10	<0.5
0.01	3C10	<0.5
0.1	3C10	<0.5
1.0	3C10	3
-	60b	<0.5
0.01	60b	<0.5
0.1	60b	2
1.0	60b	12
-	1B4	<0.5

CR1、CR3およびFcRに対する表面結合抗体はLBPコート化粒子の結合を減じないことからLBPのレセプターCD14は他のオプソニンレセプターとは異なる。

オプソニンとしてLBPはグラム陰性菌など敗血症誘発性感染体の除去を促進する。しかし、敗血症になった場合は補体や分解性酵素を含む炎症分解システムの作用またはその後の抗生物質の作用によって起こる。分解はLPSの血中レベルの増加を起す全体的なLPSの放出を誘導する。このレベルは1~1000pg LPS/mlと見られるので高アフィニティーのLPS-LBP複合体を形成するのに十分なLBPが存在する。(スターク (Stark)等、リムラスアメボサイト(Limulus Amebocyte) 凝集物テストによるバクテリア内毒素の検出、ワトソン(Watson) S. W. アラン(Alan) R. リス(Liss), NY 1987: 371-385) ヴァンデベンター(van Derent), S. J. H. Lancet 1: 605-608 (1988)。LPS-LBP複合体はマクロファージ/単球系の細胞上のCD14に結合して、モノカインTNFの迅速な合成および放出を開始し、それによって完全な敗血症への進展に有意に寄与する。

従来から知られているオプソニン、IgGはIgGコート化粒子の結合、それらの貪食作用的な取り込みおよび過酸化水素などの毒性化合物の放出を可能にする。別のオプソニン、C3は基本的にC3コート化粒子の結合を可能にする。非刺激MOによる貪食作用はC3コート化粒子がIgGを有する場合のみ誘発され(アレンバーガー(Ehlenberger)等、J. Exp. Med. 145: 857-871 (1977)、かつ過酸化水素の発生は開始しない。ライト(Wright)等、J. Exp. Med. 158: 2016-2023 (1983)。

LBPのオプソニン活性はe3のものとは非常に異なる。LBPコート化粒子はMOに強く結合するが、その場合は貪食作用または過酸化水素の放出は開始しない(第5図)。またLBPは少量のIgGでコートした粒子の貪食作用を促進する上でC3に似ている(第4図)。LBPのオプソニン効果は唯一の点でC3と異なる。補体たんぱく質はMOをPMA (ライト(Wright)等、J. Exp. Med. 156: 1149-1164 (1982)) またはフィブネクチン (ライト(Wright)等、J. Exp. Med. 158: 1338-1343 (1983)) などの補助

特表平5-501399 (10)

0.01	1B4	2
0.1	1B4	13
1.0	1B4	40

1. 全てのモノクローナル抗体は最終濃度1μg/mlとなるように添加した。
2. TNF測定は標準物質としてmgあたり2×10³ ユニットの比活性を有する組換えTNFを用いたWEHIクロン13測定法で行った。
3. 抗CD14 mAb。

第8表からヒト血液中のLPS誘導TNF生産はLPS濃度の増加とともに増加することが分る。さらに、LPS-LBP複合体誘導TNF生産は抗CD14抗体3C10および60bによって有意に阻害されるが、抗CD14 1B4モノクローナル抗体はTNF生産を有意に阻害しないことが分る。スムーズ型バクテリア大腸菌0111:B4から単離したLPSで同じ実験を行ない、炭水化物含量は異なるがリビドA構造は保存されているLPS誘導物に関するその一般性が示された。

血液中に存在する細胞毒性のTNF特異性はマチソン(Matthison)等、J. Clin. Invest. 81: 1925 (1988) に述べられているようにポリクローナルヤギ抗ヒトTNF IgG抗体を用いて確認した。この抗体はLPS処理血液サンプル中の全ての細胞毒性を完全に中和した。

17. 実施例1~16の結果に関する考察

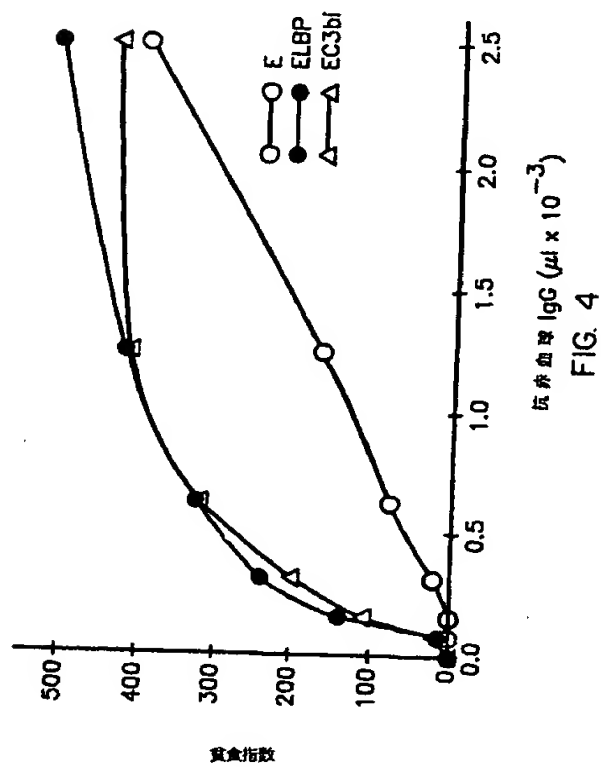
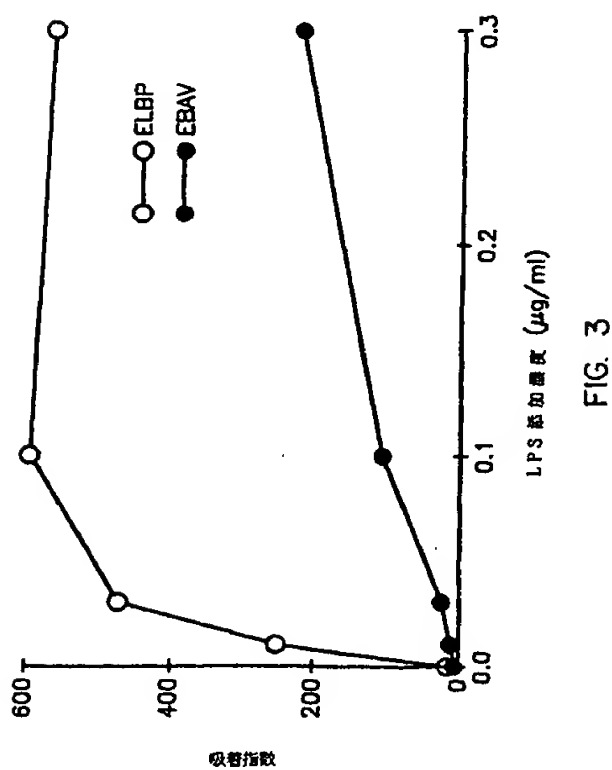
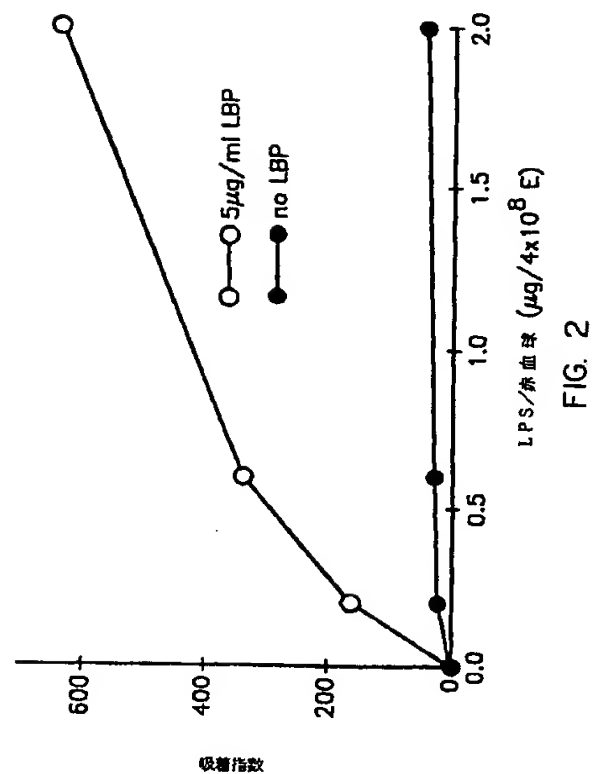
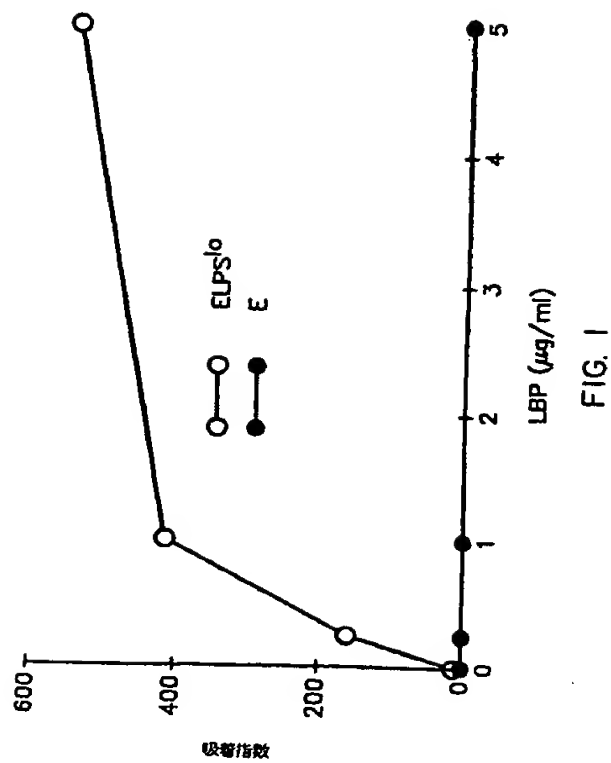
これまで述べてきた事項はLPSがバクテリアに結合しオプソニンとして機能することおよびマクロファージによりその結合および貪食作用が容易になることを示している。LBPはBPIのLPS結合ドメインと相同的なドメインを介してLPSと結合する一方、LBPの細胞への吸着はLBPにユニークなドメインに仲介されると考えられている。

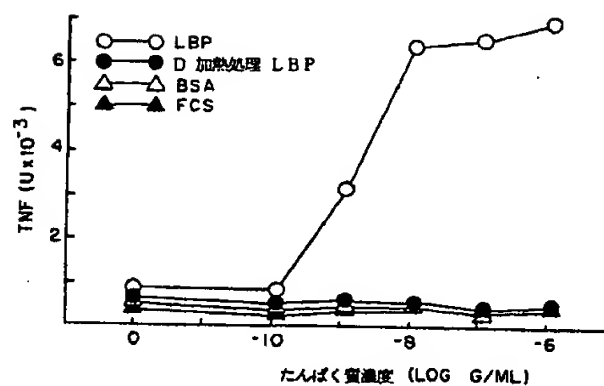
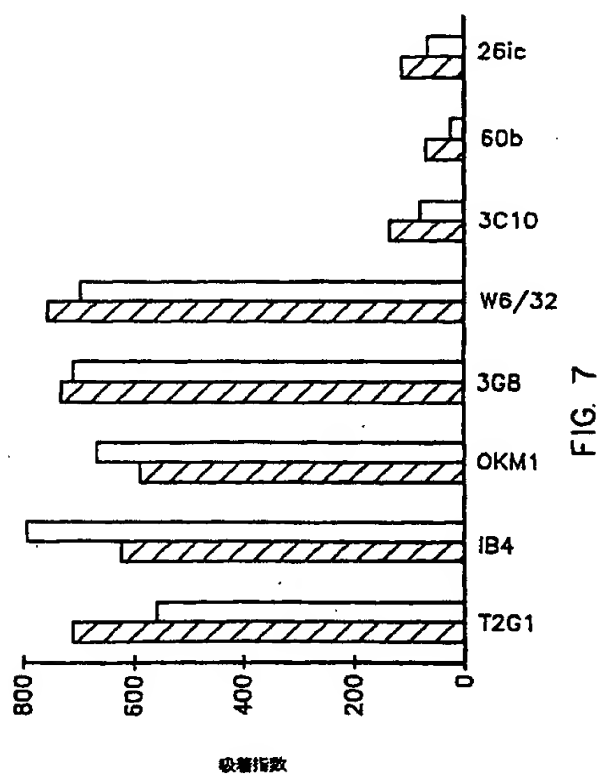
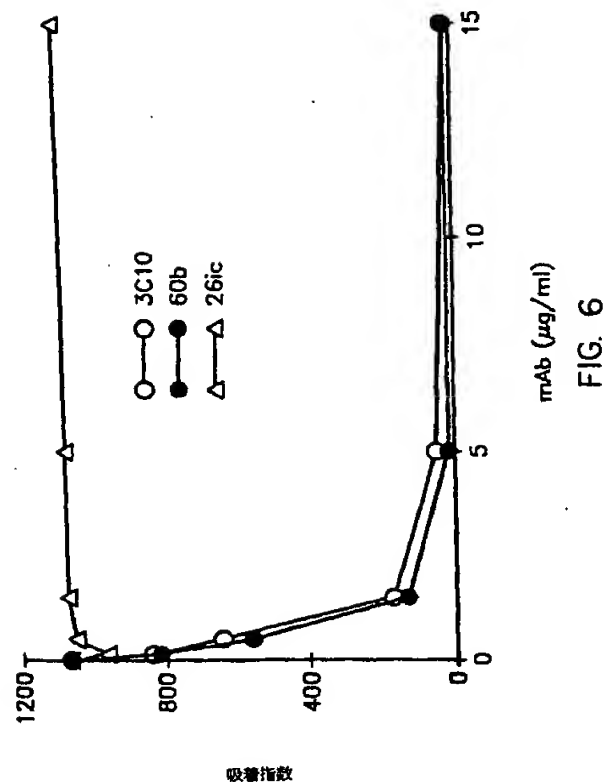
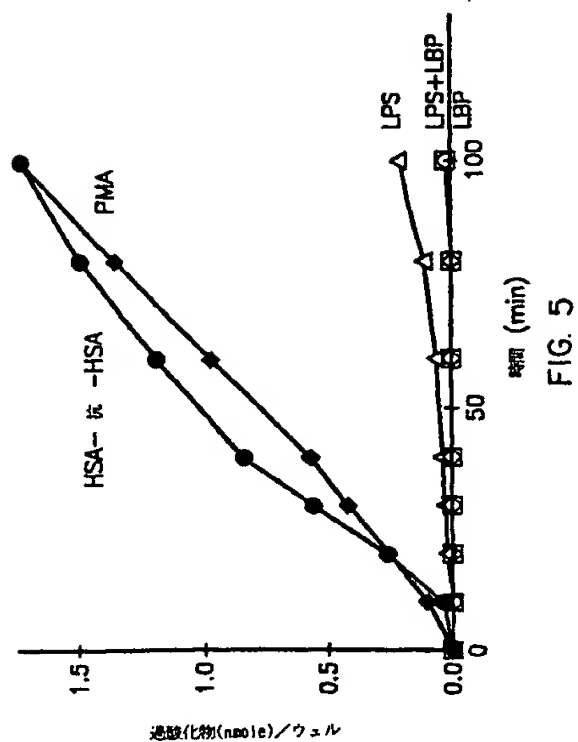
LPSコート化粒子表面のLBPはMO上の表面を移動する特異的レセプターCD14によって認識される。LBPコート化粒子はMOなどCD14発現細胞に結合するが他の血液細胞には結合しない。MOの頂点表面の結合活性はLBP-LPS複合体でコートした基質上を細胞が遊走することにより消失する。

刺激物で処理した場合貪食作用を開始するが、LBPはそうのように刺激した細胞で貪食作用を仲介しない。

オプソニンとして作用することによりLBPは動物体内においてグラム陰性バクテリアの遊走を制限する。急性状態におけるLBPの出現が感染との戦いうまく適応する。それゆえ、LBPはグラム陰性菌などの感染体に対する防御システムを代表するものであると考えられる。

特定の態様および実施例を含むこれまでの明細は本発明を説明するものでありこれを制限するものではない。本発明の精神および範囲を逸脱することなしに多くの変形や修正が可能である。





Attachment to PCT/ISA/210
VI. Invitation

Group I, claims 1-9, 12-13, 20, 22, 24, drawn to a method of treatment for sepsis anti-CD14 antibodies and/or antibiotics. Should Group I be elected, a further election of species is required with regard to the four general types of sepsis-producing organisms listed on claims 8 and 9. In the absence of an election, the species of claim 8 (gram-negative bacteria) will be examined along with claim 1-9.

Group II, claims 10-11, 21, 23, 24, drawn to a method of treating sepsis using anti-CD14 antibodies and anti-TNF antibodies, and/or antibiotics.

Group III, claims 14-16, drawn to a method of treating endotoxemia using anti-CD14 antibody.

Group IV, claims 17, 20, drawn to a method of treating sepsis using anti-LPS binding-protein antibody.

Group V, claims 18-19, drawn to a method of treating sepsis using a peptide analog of LPS binding protein.

The inventions listed as Groups I-V do not meet the requirements for unity of invention for the following reasons: Each group is drawn to a different combination of active agents or to different disease states, for instance Group I does not use anti-TNF antibodies, Group II does. Group I is drawn to a method for treating endotoxemia, a different disease state from the sepsis of Groups I, II, IV and V. Groups IV and V are drawn to methods of treatment using structurally different, products antibodies or peptides. The anti-CD14 antibodies of Groups I, II and III appear to differ from the anti-LPS binding protein antibodies of Group IV.

第1頁の続き

②発明者	トービマス ピーター	アメリカ合衆国	カリフォルニア州	92024	エンシニタス	アーデン	ドライブ	564
②発明者	ライト サミュエル デー	アメリカ合衆国	ニューヨーク州	10021	ニューヨーク	ヨーク	アベニュー	6エヌー1161
②発明者	マシソン ジョン デー	アメリカ合衆国	カリフォルニア州	92124	サン	ディエゴ	バグエラ	コート 4952
②出願人	ロックフエラー ユニヴァーシ ティ	アメリカ合衆国	ニューヨーク州	10021	ニューヨーク	ヨーク	アベニュー	1230